

METODY BADANIA AKTYWNOŚCI INWAZYJNEJ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH*

ASSAYS FOR ANALYSIS OF TUMOUR INVASION

Zbigniew MADEJA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego,
Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie: W artykule omówiono wybrane metody służące do badań zdolności komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów. Dokonano przeglądu najważniejszych metod badania tego zjawiska zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Omówiono wykorzystanie metod videomikroskopii do bezpośredniej obserwacji tworzenia przerzutów *in vivo* oraz najważniejszych z metod *in vitro*: 2- i 3- wymiarowe konfrontacje populacji komórek nowotworowych i prawidłowych, metody przechodzenia przez pokryte białkami błony podstawnej filtry w komorach Boydena, hodowle organotypowe, metody badania aktywności ruchowej komórek nowotworowych w kokulturach z komórkami prawidłowymi oraz 3-wymiarowych żelach kolagenowych. W pracy przedstawiono podstawowe założenia wymienionych metod oraz omówiono ich ograniczenia.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; supl. 16: 81–95)

Słowa kluczowe: metody badania inwazyjności, videomikroskopia, modele zwierzęce, migracja komórek, modele *in vitro*.

Summary: The paper reviews some qualitative and quantitative experimental assays for the analysis of tumour cell invasion. The current state of development of *in vivo* videomicroscopy, which permits direct observation of steps in formation of metastasis is discussed. Various invasion assays *in vitro* are also reviewed. The 2- and 3-dimensional confrontation models for cancer invasion, transmigration in two-compartment assays, organotypic cultures, and cell motility assays in dense cultures and 3-dimensional collagen gel lattices are compared. The limitations and advantages of the presented methods are considered.

(*Advances in Cell Biology* 2001; suppl. 16: 81–95)

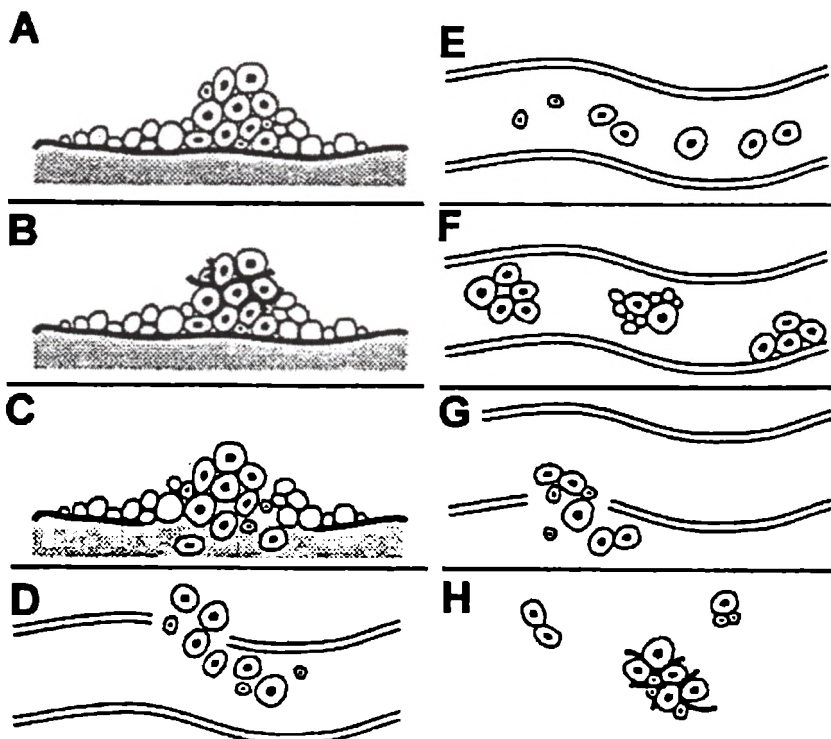
Key words: Invasion assays, videomicroscopy, animal models, cell motility, models of tumour cell invasion *in vitro*

*Praca finansowana w ramach grantu KBN 6 P04C 051 16

I. WSTĘP

Jedną z najbardziej niebezpiecznych cech chorób nowotworowych jest zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów. O ile nowotwory łagodne, tj. nie dające przerzutów, są stosunkowo łatwe w leczeniu, to nowotwory złośliwe bardzo często są powodem zgonu pacjenta. Z tego względu istnieje konieczność poznania mechanizmów rządzących procesem tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe. Badania te są jednak stosunkowo skomplikowane ze względu na złożoność i wieloetapowość procesu tworzenia przerzutów przez nowotwory.

Obecnie wyróżniane są już zasadnicze etapy całego procesu wytwarzania przerzutów (rys. 1) [8, 12, 31]. W pierwszym etapie rozwijający się nowotwór nie nacieka jeszcze sąsiednich tkanek i jest w fazie przedinwazyjnej. Aby taki guz

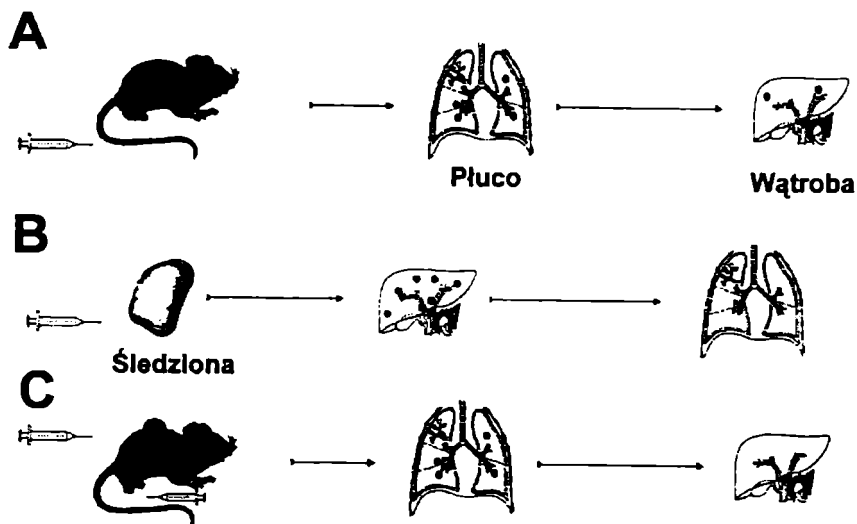


RYSUNEK 1. Etapy tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe: (A) guz w fazie przedinwazyjnej; (B) indukcja tworzenia własnych naczyń krwionośnych guza; (C) pierwszy etap tworzenia przerzutów – nabycie umiejętności przechodzenia przez błonę podstawną; (D) etap dostawiania się komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych; (E) bierne przenoszenie komórek nowotworowych przez krew do odległych części organizmu; (F) homo- i heterotypowe interakcje z innymi komórkami znajdującymi się w układzie krwionośnym; (G) ekstrawasacja – wyjście komórek nowotworowych poza naczynie krwionośne; (H) wytworzenie guzów wtórnych (wg [12] zmodyfikowane)

mógł urosnąć do większych rozmiarów, konieczna jest indukcja tworzenia własnych naczyń krwionośnych guza. Proces tworzenia przerzutów rozpoczyna się od zdobycia przez komórki nowotworowe umiejętności przechodzenia przez błony podstawne. Do przekroczenia tej bariery konieczny jest zanik naturalnie występujących połączeń pomiędzy komórkami nabłonkowymi oraz podjęcie aktywnej migracji przez komórki rakowe wraz z jednoczesną produkcją enzymów proteolitycznych. Następnie migrujące komórki dostają się do napotkanych naczyń krwionośnych albo do nowo tworzonych naczyń w obrębie guza. W tym drugim przypadku jest to ułatwione, ponieważ ściany tych naczyń mają niekompletną błonę podstawną i charakteryzują się występowaniem przerw pomiędzy komórkami endotelialnymi. Sądzi się, że w związku z tym nie stanowią one istotnej bariery dla procesów przenikania komórek do naczyń krwionośnych. Badanie krwi żyłnej powracającej z dobrze rozwiniętych guzów wskazuje, że każdego dnia duża liczba komórek nowotworowych może przedostawać się do układu krwionośnego. Następnie komórki są biernie przenoszone przez krew do odległych części organizmu. W kolejnych etapach inwazji komórki nowotworowe przyczepiają się do ścian naczyń krwionośnych w wyniku specyficznej adhezji lub też na skutek mechanicznego zatrzymania stosunkowo dużych komórek rakowych w obrębie najmniejszych naczyń krwionośnych. W miejscu zatrzymania, komórki nowotworowe tworzą ścisłe kontakty ze ścianami naczynia i wychodzą poza jego obręb dzięki poruszaniu się między komórkami endotelialnymi. Następnie komórki nowotworowe aktywnie migrują do wybranych miejsc, gdzie zaczynają proliferować i tworzyć guzy wtórne. Stosunkowo duża złożoność omawianego procesu zaowocowała szeregiem różnego rodzaju metod biologicznych pozwalających na badanie tego zjawiska.

II. EKSPERYMENTALNE MODELE BADANIA TWORZENIA PRZERZUTÓW *IN VIVO*

Popularnym układem do badań aktywności metastatycznej nowotworów *in vivo* są modele mysie, w których określona liczba komórek nowotworowych (zwykle kilkaset tysięcy do kilku milionów) jest wstrzykiwana do żyły ogonowej, śledziony lub podskórnie, a następnie po określonym czasie określa się ilość i wielkość przerzutów powstałych w różnych organach ciała zwierzęcia (rys. 2) [28, 37]. Inną metodą jest badanie lokalnej inwazyjności przez miejscowe wstrzykiwanie komórek nowotworowych bezpośrednio do badanego organu i histologiczne określenie stopnia inwazyjności [32]. Dzięki zastosowaniu takich metod można stwierdzić, czy badane komórki nowotworowe są zdolne do tworzenia przerzutów oraz określić miejsce ich lokalizacji. Można również badać wpływ różnego rodzaju środków terapeutycznych na wydajność procesu tworzenia przerzutów. Największą zaletą takiej metody jest stosunkowo wierne odtworzenie całej złożoności układu. Głównym



RYSUNEK 2. Schemat postępowania w badaniach aktywności metastatycznej nowotworów *in vivo*. Określona liczba komórek nowotworowych jest wstrzykiwana do żyły ogonowej (A), śledziony (B) lub podskórnie (C), a następnie po określonym czasie określa się ilość i wielkość przerzutów (na schemacie czarne kropki) powstałych w różnych organach ciała zwierzęcia (wg [37] zmodyfikowane)

zaś ograniczeniem jest określanie jedynie początkowego i końcowego etapu całego procesu, tj. liczby komórek wstrzykiwanych i liczby powstałych guzów. Etapy pośrednie procesu tworzenia przerzutów nie są obserwowane bezpośrednio, dlatego wnioski dotyczące czasu i miejsca działania poszczególnych czynników wpływających na wynik końcowy oparte są jedynie na przypuszczeniach.

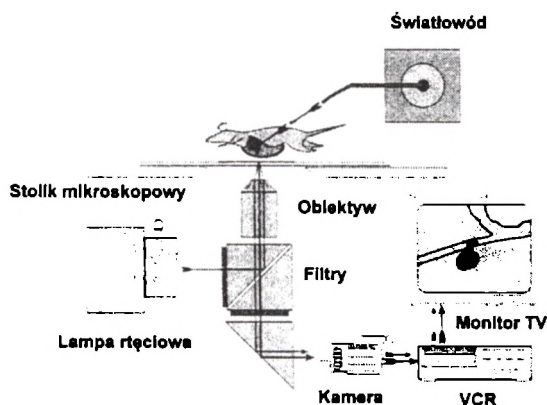
Próba ominięcia wspomnianych ograniczeń było wprowadzenie do badań mechanizmów tworzenia przerzutów videomikroskopii *in vivo* [8, 9, 27, 28]. Celem wprowadzenia tej techniki było umożliwienie badania w drodze bezpośredniej obserwacji poszczególnych etapów procesu tworzenia przerzutów i scharakteryzowanie losu komórek rakowych od początkowego zatrzymania w układzie mikronaczyniowym aż do formowania unaczynnionych guzów. Aby tego rodzaju obserwacje były możliwe, konieczne było opracowanie układu optycznego, który zapewniał spełnienie kilku warunków [28]:

- (1) umożliwiał identyfikację wstrzykniętych komórek nowotworowych w obrębie badanego organu;
- (2) pozwalał na ich wizualizację z wystarczającym kontrastem i rozdzielczością w celu określenia ich lokalizacji w sposób nieszkodliwy dla otaczających struktur;
- (3) stwarzał możliwość chirurgicznego eksponowania nie poddanych sekcji organów (wątroba, płuco, mięśnie itd.) do takiej głębokości, do jakiej komórki nowotworowe mogą się dostać dzięki niezaburzonemu, normalnemu przepływowi krwi;

- (4) wykorzystany w badaniach system optyczny musi mieć głębokość pola widzenia wystarczająco płytką, aby zapobiegać optycznemu rozwarstwieniu organu i zapobiegać nakładaniu się obrazów ze struktur leżących ponad i pod obserwowaną płaszczyzną;
- (5) konieczne jest utrzymanie nieruchomego pola widzenia żywego preparatu, w którym występuje ciągły ruch powodowany oddychaniem i biciem serca badanego zwierzęcia;
- (6) konieczne jest właściwe oświetlenie do zapewnienia wysokiej rozdzielczości obrazów video;
- (7) dla celów statystycznych możliwe musi być określenie liczby komórek, które dotarły do badanego obszaru oraz kontrolowanie stopnia ich przeżywalności.

Podstawowy sprzęt używany w tego typu badaniach zbliżony jest swoją budową do układów używanych do analizy obrazów mikroskopowych w biologii komórki [29, 30]. Dokładnie konstrukcję sprzętu stosowanego w videomikroskopii *in vivo* opisuje w swojej pracy MacDonald i wsp. [28]. W skład takiego układu wchodzi fluorescencyjny mikroskop odwrócony z oświetleniem epi i stolikiem wystarczająco dużym, aby zmieścić zwierzę doświadczalne (rys. 3). Uśpione zwierzę jest poddawane zabiegowi chirurgicznemu odsłaniającemu badany organ: wątrobę, płuco, śledzionę lub mięsień. Następnie zwierzę jest umieszczane na platformie posiadającej okienko zrobione ze szkła nakrywkowego, tak aby organ mógł być widoczny od spodu. W ten sposób powierzchnia tkanki spoczywającej na okienku pozostaje w płaszczyźnie ostrości, nawet jeśli góra powierzchnia podnosi się i opada w związku z oddychaniem i biciem serca zwierzęcia. Transiluminacja tkanki jest przeprowadzana za pomocą skośnie ustawianego światłowodu. Rejestracja obrazu następuje przy użyciu kamery i magnetowidu. Komórki nowotworowe są wcześniej znakowane

fluorescencyjnie i identyfikowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej z oświetleniem epi. Komórki wstrzykiwane bezpośrednio do krwioobiegu mogą być kierowane do określonych organów, a następnie możliwa jest obserwacja takich procesów, jak: zatrzymywanie komórek nowotworowych w naczyniach i ich aktywne opuszczenie, czyli ekstrawasacja oraz przemieszczanie się komórek w obrębie kolonizowanego organu.



RYSUNEK 3. Schemat układu do videomikroskopii *in vivo* – opis w tekście (wg [29] zmodyfikowane)

Trudno omawiać tutaj dokładnie wszystkie wyniki otrzymane przy użyciu tej metody, jednak warto zwrócić uwagę na pewne ogólne obserwacje poczynione przez autorów, nie zawsze zgodne z powszechnie przyjętymi poglądami [8, 9, 27, 28]. W badanym przez siebie okresie czasu stwierdzili, że ogromna większość wstrzykiwanych komórek nowotworowych przeżywa w układzie krwionośnym. Przeżywalność w ciągu doby wynosiła 80–90%. Na podstawie badań *in vitro* dotychczas sądzono, że większość komórek nowotworowych jest niszczona przez ciśnienie hemodynamiczne w układzie krążenia; po zatrzymaniu w naczyniach włosowatych komórki miały ulegać deformacji i naciąganiu błony komórkowej aż do momentu jej pęknięcia [42, 43]. Dzięki videomikroskopii stwierdzono również, że większość komórek jest zatrzymywana na zasadzie mechanicznej, w pierwszym napotkanym układzie naczyń włosowatych i tam opuszcza naczynia. Wcześniejsze badania *in vitro* [38] oraz znany fakt, że określone typy nowotworów dają preferencyjne przerzuty do określonych organów zdają się nie potwierdzać tych obserwacji, należy jednak zwrócić uwagę, że zatrzymanie komórek nowotworowych w określonym organie nie przesądza jeszcze o rozwinięciu się w tym miejscu przerzutu. Zastosowanie videomikroskopii pozwoliło również stwierdzić, że praktycznie wszystkie zatrzymane w naczyniach włosowatych komórki nowotworowe aktywnie opuszczają naczynia krwionośne, lecz jedynie znikoma liczba komórek wychodzących z naczynia jest w stanie podjąć proliferację i wytworzyć mikroprzerzuty. Obserwacja ta sugeruje, że właśnie ten etap tworzenia przerzutów może mieć kluczowe znaczenie dla powstawania guzów wtórnych, potwierdzając pochodzącą jeszcze z końca XIX wieku koncepcję *seed and soil* podkreślającą istotne znaczenie środowiska wytwarzanego przez poszczególne tkanki dla podjęcia przez metastatyczną komórkę nowotworową wzrostu w nowym miejscu [36].

Omawiane badania przeprowadzono na wielu różnych liniach komórkowych i różnych zwierzętach doświadczalnych [8, 9, 27, 28]. Oczywiście otwarte pozostaje pytanie, na ile wiernie taki układ doświadczalny odwzorowuje tworzenie przerzutów w naturze. Jednak wydaje się, że wnioski wynikające z analizy wyników takich doświadczeń, często odbiegające od powszechnie przyjętych opinii, zasługują na uwagę.

III. MODELE BADANIA INWAZYJNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH *IN VITRO*

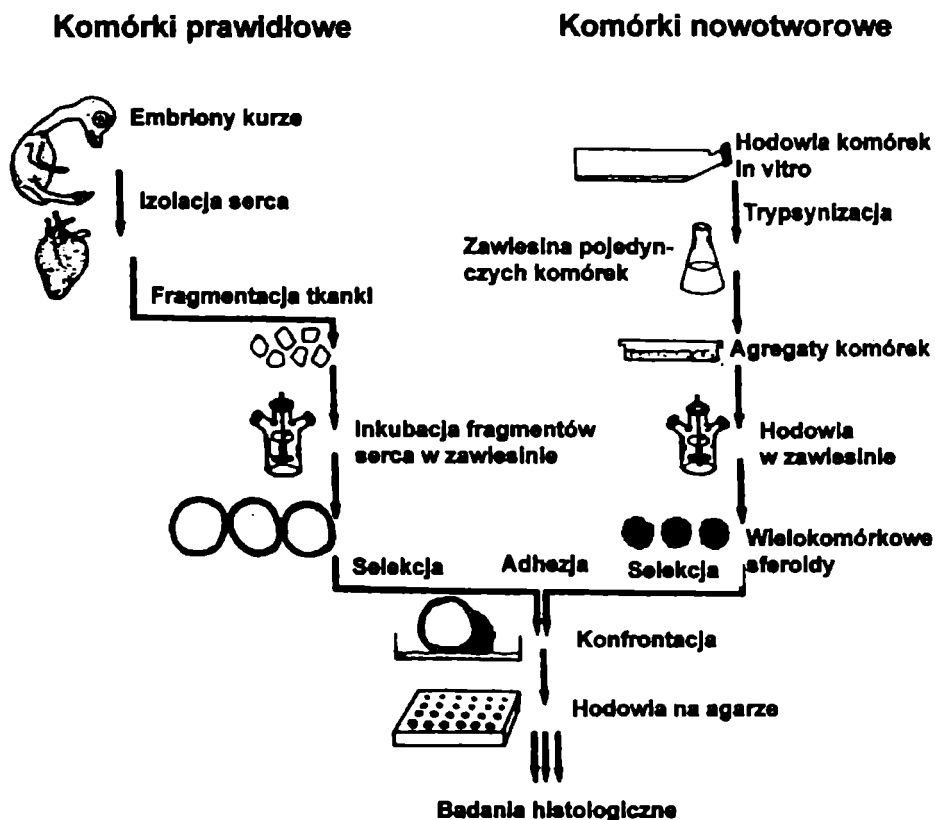
Zastosowanie nawet najbardziej skomplikowanych metod *in vivo* nie daje możliwości szczegółowych badań mechanizmów rządzących poszczególnymi etapami tworzenia przerzutów. W tym celu opracowano szereg modeli *in vitro* pozwalających na badanie poszczególnych etapów przerzutowania w kontrolowanych i powta-

rzalnych warunkach doświadczalnych. W zależności od potrzeb stosowane metody kładą nacisk na różne aspekty procesu tworzenia przerzutu:

- (1) wzrost nowotworu w określonym mikrośrodkowisku stworzonym przez poszczególne tkanki;
- (2) oddziaływanie pomiędzy inwazyjnymi komórkami nowotworu a prawidłowymi komórkami gospodarza oraz wzajemne oddziaływania pomiędzy komórkami nowotworowymi w czasie inwazji;
- (3) oddziaływanie komórek nowotworowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej.

Ciekawym przykładem połączenia metod *in vivo* z metodami *in vitro* jest metoda zaproponowana przez R. Hoffmana i wsp. [10] (oparta na układach doświadczalnych opracowanych wcześniej przez Leightona [24, 25]), pozwalająca na długotrwałe badanie wzrostu guzów wtórnych (indukowanych u myszy w doświadczeniach *in vivo*) w organotypowych hodowlach *in vitro*. W metodzie tej transfekowane GFP (ang. *green fluorescent protein*) ludzkie komórki raka płuca wstrzykiwano do żyły ogonowej bezwłosych myszy i po 7 dniach obserwowano powstawanie przerzutów w obrębie płuc. Następnie kawałki płuca z powstałymi przerzutami przenoszono do hodowli organotypowej prowadzonej w żelu kolagenowym. W tak prowadzonej hodowli można było następnie obserwować wzrost komórek nowotworowych przez długi okres w kontrolowanych warunkach. Metoda ta pozwalała również na bezpośrednie umieszczenie komórek nowotworowych w obrębie różnych tkanek i badanie wzrostu kolonii komórek rakowych w obrębie badanego organu *in vitro*.

Spośród stosowanych metod badania inwazyjności komórek nowotworowych *in vitro* stosunkowo często stosowane są testy oparte na obserwacji zachowania się komórek podczas konfrontacji populacji potencjalnych komórek metatstatycznych z prawidłowymi komórkami lub tkankami [2, 11, 32, 39]. Metody tego typu możemy podzielić na modele konfrontacji w układach trójwymiarowych i dwuwymiarowych. W przypadku modeli trójwymiarowych komórki nowotworowe hodowane *in vitro* inkubuje się w odpowiednich warunkach, aby otrzymać wielokomórkowe sferoidy [rys. 4]. Równocześnie otrzymuje się fragmenty zdrowej tkanki, np. fragmenty serca kurczaka. Następnie doprowadza się do adhezji tych dwóch wielokomórkowych fragmentów, inkubuje się je przez określony czas (kilku do kilkunastu dni), utrzuca, zatapia w parafinie, tnie na kilkumikrometrowe skrawki i barwi histologicznie lub przy użyciu specyficznych przeciwciał [7, 39]. W wyniku zastosowania takiej procedury powstaje preparat, na którym widzimy fragment prawidłowej tkanki, w obrębie której można zidentyfikować inwazyjne komórki nowotworowe. Trójwymiarowe metody konfrontacji bardziej przypominają sytuację obserwowaną w naturze niż metody dwuwymiarowe, jednak ich analiza opiera się na takich samych zasadach jak w przypadku guzów naturalnych – mianowicie przy zastosowaniu metod histologicznych lub mikroskopii elektronowej. Z tego względu podobnie jak większość metod *in vivo* jest to metoda pośrednia, w której obserwujemy jedynie sytuację



RYSUNEK 4. Schemat postępowania przy badaniu inwazyjności komórek nowotworowych metodą trójwymiarowej konfrontacji komórek metatstatycznych z komórkami lub tkankami prawidłowymi. Opis poszczególnych etapów w tekście (wg [6] zmodyfikowane)

na początku i na końcu eksperymentu. Ponadto w większości przypadków metoda ta jest traktowana jako jakościowa, a nie ilościowa [32]

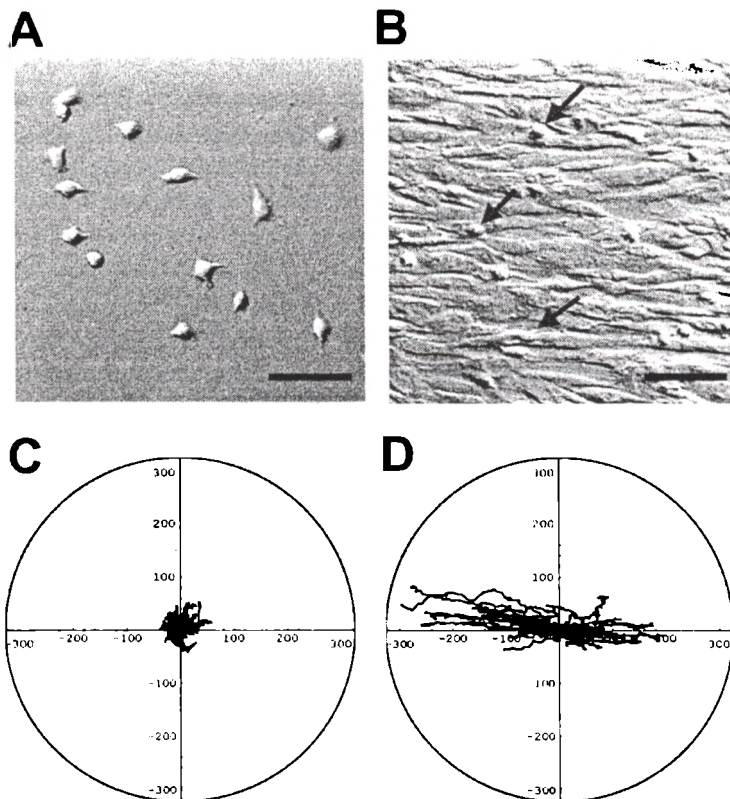
Bezpośrednia obserwacja dokonujących inwazji komórek nowotworowych możliwa jest dzięki zastosowaniu metod konfrontacji dwóch populacji komórek w układzie dwuwymiarowym [2, 11]. W tym przypadku fragmenty tkanki prawidłowej i nowotworowej umieszcza się w naczyniu hodowlanym w niewielkiej od siebie odległości. Migrujące z agregatu komórki nowotworowe napotykają na swojej drodze fragment tkanki prawidłowej i w zależności od stopnia inwazyjności z różną wydajnością przedostają się pomiędzy komórkami prawidłowymi na obszar zajmowany przez zdrową tkankę.

Modyfikację takiego sposobu badania stopnia inwazyjności komórek nowotworowych stosujemy w naszych własnych badaniach prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki IBM UJ. W badaniach tych koncentrujemy się na obserwacji zmian

aktywności ruchowej komórek nowotworowych w wyniku kontaktu z komórkami prawidłowymi. Zastosowanie takiej metody pozwala na długoczasowe obserwacje dowolnych komórek nowotworowych poruszających się po powierzchni lub w sąsiedztwie dowolnych komórek prawidłowych. Na rysunku 5 przedstawiono wyniki badań wpływu bezpośredniego kontaktu komórek mięsaka XC z prawidłowymi fibroblastami skóry [23]. W wyniku kontaktu z komórkami prawidłowymi średnie przemieszczenie migrujących komórek XC w trakcie 8 godzinnego doświadczenia wzrosło z 11 μm w kontroli bez kontaktów z innymi komórkami do 88 μm dla komórek migrujących po warstwie fibroblastów. Wzrostowi temu nie towarzyszył wzrost prędkości ruchu, a był on jedynie wynikiem polaryzacji ruchu związanej ze zjawiskiem naprowadzania kontaktowego. Podobną reakcję zaobserwowaliśmy również w przypadku komórek raka prostaty oraz w mniejszym stopniu komórek czerniaka.

Ponieważ w pierwszych etapach inwazji komórki nowotworowe poruszają się zwykle pozostając w kontakcie z sąsiednimi komórkami nowotworowymi, podobne podejście metodyczne zastosowaliśmy w badaniach wpływu na ich aktywność ruchową homotypowych oddziaływań pomiędzy komórkami (rys. 6). Dotychczas dominującym poglądem było, że o ile w przypadku komórek prawidłowych zwiększanie ilości kontaktów pomiędzy komórkami np. w wyniku wzrostu gęstości hodowli prowadzi do zahamowania ich ruchu (tzw. kontaktowe zahamowanie migracji), to w przypadku komórek nowotworowych zjawisko to nie występuje lub jest w jakimś stopniu ograniczone [1, 3, 17, 18]. W naszych badaniach wykazaliśmy ilościowo dla 4 linii komórek nowotworowych istnienie zjawiska odwrotnego od zahamowania kontaktowego migracji, tj. wzrostu prędkości ruchu i średniego przemieszczenia migrujących komórek nowotworowych pod wpływem wzajemnych kolizji (rys. 6). Przedstawione wykresy prezentują przykładowe trajektorie komórek nowotworowych poruszających się bez tworzenia wzajemnych kontaktów lub w gęstej hodowli oraz zależność prędkości ruchu od gęstości hodowli dla komórek prawidłowych i nowotworowych.

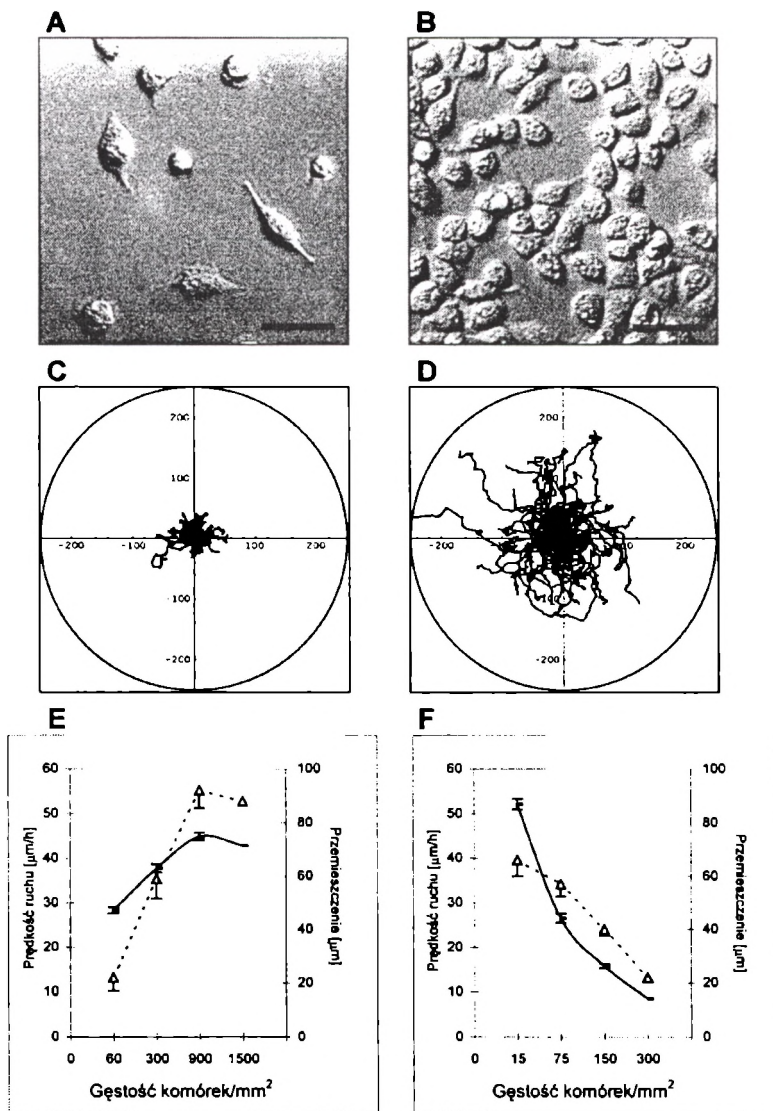
Trochę inne podejście do badania inwazyjności komórek nowotworowych w podobnym układzie doświadczalnym zaproponował Verschuere i wsp. [40, 41]. Opracowana przez jego zespół metoda polegała na zastosowaniu różnych rodzajów mikroskopii optycznej do oceny liczby komórek nowotworowych zdolnych do przechodzenia poprzez warstwę komórek prawidłowych. Komórki nowotworowe niezdolne do przechodzenia na drugą stronę warstwy komórek prawidłowych pozostawały okrągłe z charakterystycznym jasnym halo widocznym w mikroskopii kontrastowo-fazowej. Natomiast komórki zdolne do przemieszczenia się na drugą stronę rozpląszczały się na podłożu wyraźnie różniąc się od komórek będących na powierzchni prawidłowych fibroblastów. Ewentualne wątpliwości, czy komórki rozpląszczyły się na powierzchni szkła czy na powierzchni fibroblastów można rozstrzygnąć obserwując równolegle badane komórki przy użyciu interferencyjnej



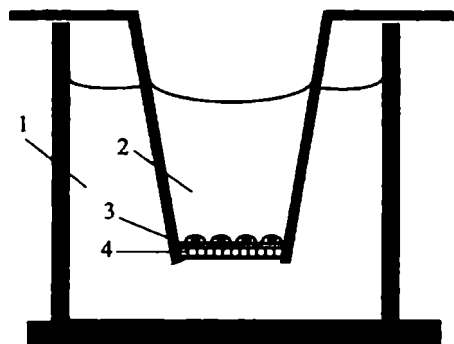
RYСУNEK 5. Wpływ heterotypowych oddziaływań komórka-komórka na aktywność ruchową komórek nowotworowych. Rysunek przedstawia wyniki badań migracji komórek mięsaka szczura XC po powierzchni zahamowanych kontaktowo prawidłowych fibroblastów. W wyniku kontaktu z komórkami prawidłowymi średnie przemieszczenie migrujących komórek XC w trakcie 8 godzinnego doświadczenia wzrosło z 11 μm w kontroli bez kontaktów z innymi komórkami do 88 μm dla komórek migrujących po warstwie fibroblastów. Wzrostowi temu nie towarzyszył wzrost prędkości ruchu, a był on jedynie wynikiem polaryzacji ruchu związanej ze zjawiskiem naprowadzania kontaktowego. Komórki XC wykazywały tendencję do poruszania się wzdłuż długiej osi komórek prawidłowych. (A) Komórki XC migrujące bez kontaktu z komórkami prawidłowymi, skala 100 μm; (B) komórki XC migrujące po powierzchni fibroblastów, strzałki wskazują położenie komórek nowotworowych. (C) Trajektorie ruchu 50 komórek XC w kontroli i w warunkach kontaktu z fibroblastami (D). Wykresy te przedstawiają szlaki poruszających się komórek sprowadzone do jednego punktu wyjściowego znajdującego się w początku układu współrzędnych. Kierunek osi 0X odpowiada ułożeniu długiej osi fibroblastów

mikroskopii odbiciowej, w której obszary komórki mocno przyczepione do szkiełka dają charakterystyczne zaciemnienie obrazu.

Oprócz bezpośredniego oddziaływania z różnymi komórkami, komórki inwazyjne mają do pokonania na swojej drodze jeszcze inne bariery takie jak błona podstawna



RYСУNEK 6. Wpływ homotypowych oddziaływań komórka-komórka na aktywność ruchową komórek nowotworowych na przykładzie komórek czerniaka B16. W wyniku bezpośrednich kontaktów homotypowych średnie przemieszczenie migrujących komórek B16 w trakcie 7 godzinnego doświadczenia wzrosło z $21,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$ w kontroli bez kontaktów z innymi komórkami do $87,7 \pm 6,7 \mu\text{m}$ w warunkach kontaktu z komórkami sąsiednimi. Wzrostowi temu towarzyszył wzrost prędkości ruchu (odpowiednio $28,2 \pm 0,7 \mu\text{m/godz.}$ i $44,8 \pm 0,9 \mu\text{m/godz.}$). Efekt ten nie był wywołany aktywnością czynników wydzielanych przez komórki do pożywki. (A) Komórki B16 migrujące bez kontaktu z komórkami sąsiednimi, skala $50 \mu\text{m}$; (B) komórki B16 migrujące w gęstej hodowli w warunkach fizycznego kontaktu z komórkami sąsiednimi. Trajektorie ruchu 50 komórek B16 w migrujących bez kontaktu z komórkami sąsiednimi (C) i w warunkach umożliwiających taki kontakt (D). (E,F) Porównanie wpływu gęstości hodowli na aktywność ruchową nowotworowych komórek czerniaka B16 (E) i prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej (F). Na wykresach średnią prędkość ruchu komórek oznacza linia ciągła, a średnie przemieszczenie linia przerywana



RYSUNEK 7. Schemat modyfikacji komory Boydena używanej w badaniach aktywności metastatycznej komórek nowotworowych. (1,2) rozdzielone błoną z porami o określonej średnicy dwa przedziały komory; (3) badane komórki; (4) błona porowata pokryta matrygelem

oraz inne niekomórkowe elementy wchodzące w skład tkanki łącznej. Niewątpliwie ze względu na prostotę jednym z najpopularniejszych testów badających ten aspekt tworzenia przerzutów jest metoda oparta na zastosowaniu komór Boydena, w których standardową błonę z porami o określonej średnicy rozdzielającą dwa przedziały komory zastępuje analogiczna błona pokryta matrygelem (rys. 7) [6, 20,21, 22, 34]. Matrygel jest ekstraktem z mięsaka myszy bogatym w składniki błony podstawnej takie, jak: laminina, kolagen IV i proteoglikany. Powleczoney takim ekstraktem filtr dobrze naśladuje budowę błony podstawnej. Podobną technikę, opierającą się o wykorzystanie komór Boydena, można również zastosować badając przemieszczanie się komórek przez naturalne błony biologiczne takie, jak np. błona owodniowa [19]

lub cienkie skrawki żywej tkanki [35]. We wszystkich wymienionych przypadkach badane komórki wysiewa się na jedną stronę filtra i po pewnym czasie liczy się, ile komórek przedostało się przez pory w filtrze na drugą stronę (rys. 7). Zwiększona liczba komórek przechodzących przez filtr świadczy o większej aktywności metastatycznej. Końcowy wynik jest jednak wypadkową aktywności migracyjnej komórek, ich zdolności do przeciskania się przez wąskie pory błony oraz zdolności do aktywnego trawienia pozakomórkowej macierzy białkowej.

Znacznie więcej informacji na temat zjawisk zachodzących w czasie poruszania się komórki w macierzy zewnątrzkomórkowej dostarczają metody bezpośredniej obserwacji komórek. P. Friedl wraz ze współpracownikami opracował metodę pozwalającą na precyzyjną charakterystykę poruszania się komórki w trójwymiarowym żelu kolagenowym. Dzięki kombinacji metod videomikroskopii oraz mikroskopii konfokalnej możliwe jest nie tylko wyznaczanie dokładnych szlaków migracji komórek i ich precyzyjny pomiar ilościowy, ale również opis wzajemnego oddziaływania komórek z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i rozkładu określonych białek receptorowych na powierzchni komórki [13, 14, 15, 16, 33].

Istotnym elementem procesu tworzenia przerzutów jest zdolność komórek metastatycznych do adhezji do określonych komórek i struktur tkankowych [8, 12, 26, 31]. Istnieje wiele dowodów na istnienie wybiórczej adhezji komórek nowotworowych do śródbłonna pochodzącego z określonych tkanek [4, 5]. W badaniach

tych stosuje się takie same metody jak we wszystkich innych badaniach adhezji komórek. Z tego względu metody te nie będą tutaj szerzej omawiane.

IV. PODSUMOWANIE

Trwające od wielu lat intensywne badania mechanizmów tworzenia przerzutów zaowocowały opracowaniem wielu różnych metod badawczych. Stosowane obecnie techniki pozwalają na badania mechanizmów tworzenia przerzutów zarówno w układach *in vivo*, jak i *in vitro*. Różnorodność stosowanych metod pozwala na szczegółowe badania kolejnych etapów całego procesu w kontrolowanych warunkach doświadczalnych. Poszczególne rodzaje metod kładą nacisk na różne aspekty tworzenia przerzutów. Pozwala to na badania mechanizmów kontrolujących kolejne etapy tworzenia przerzutów i stwarza nadzieję na pełniejsze zrozumienie całego procesu, konieczne do opracowania skuteczniejszych metod leczenia chorób nowotworowych.

LITERATURA

- [1] ABERCROMBIE M. Contact inhibition and malignancy. *Nature* 1979; **281**: 259–262.
- [2] ABERCROMBIE M., HEAYSMAN JEM. Invasive behavior between sarcoma and fibroblast populations in cell culture. *J Natn Cancer Inst* 1976; **56**: 561–570.
- [3] ABERCROMBIE M., TURNER AA. Contact reactions influencing cell locomotion of a mouse sarcoma cells in culture. *Med Biol* 1978; **56**: 299–303.
- [4] ALBY L, AUERBACH R. Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1984; **81**: 5739–5743.
- [5] AUERBACH R, LU CW, PARDON E, GUMKOWSKI F, KAMINSKA G, KAMINSKI M. Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: An *in vitro* correlate of preferential metastasis *in vivo*. *Cancer Res* 1987; **47**: 1492–1496.
- [6] BIROCCIO A, CANDILORO A, MOTTOLESE M, SAPORA O, ALBINI A, ZUPI G, DEL BUFALO D. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and *in vivo* angiogenesis in a breast carcinoma line. *FASEB J* 2000; **14**: 652–660.
- [7] BRÄUNER T. Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum maligner Zellen. Verlag Stöffler & Schütz, Stuttgart 1987.
- [8] CHAMBERS AF. The metastatic process: basic research and clinical implications. *Oncology Res* 1999; **11**: 161–168.
- [9] CHAMBERS AF, MACDONALD IC, SCHMIDT EE, KOOP S, MORRIS VL, KHOKHA R, GROOM AC. Steps in tumor metastasis: New concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 1995; **14**: 279–301.
- [10] CHISHIMA T, YANG M., MIYAGI Y, LI L, TAN Y, BARANOV E, SHIMADA H, MOOSSA AR, PENMAN S, HOFFMAN RM. Governing step of metastasis visualized *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 11573–11576.
- [11] EASTY GC, HAEMMERLI G, EASTY DM, STRAULI P. Interaction between normal epithelial and squamous carcinoma cells in monolayer culture. *Cancer Res* 1982; **42**: 4248–4255.

- [12] EFFERT PJ, STROHMEYER TG. Theories on the metastatic process and possible therapeutic options. *Urol Res* 1995; **23**: 11–19.
- [13] FRIEDL P, NOBLE PB, ZÄNKER KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods* 1993; **165**: 157–165.
- [14] FRIEDL P, NOBLE PB, ZÄNKER KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Expression and function of cell adhesion molecules. *J Immunol* 1995; **154**: 4973–4985.
- [15] FRIEDL P, MAASER K, KLEIN E, NIGGEMANN B, KROHNE G, ZÄNKER KS. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of 2 and integrins and CD44. *Cancer Res* 1997; **57**: 2061–2070.
- [16] FRIEDL P, ZÄNKER KS, BRÖCKER EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 1998; **43**: 369–378.
- [17] GAIL M. Time lapse studies on the motility of fibroblasts in tissue culture. [w] R Porter, DW Fitzsimons [red] Locomotion of Tissue Cells. Ciba Found. Symposium 14, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, London, New York, 1973: 297–310.
- [18] GAIL MH, BOONE CW. Density inhibition of motility in 3T3 fibroblasts and their SV40 transformants. *Exp Cell Res* 1971; **64**: 156–162.
- [19] GRIMSTAD IA. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. *Exp Cell Res* 1987; **173**: 515–523.
- [20] HAJITOU A, DEROANNE C, NOEL A, COLLETTE J, NUSGENS B, FOIDART JM, CALBERG-BACQ CM. Progression in MCF-7 breast cancer cell tumorigenicity: compared effect of FGF-3 and FGF-4. *Breast Cancer Res Tr* 2000; **60**: 15–28.
- [21] KIM JW, CHO HS, KIM JH, HUR SY, KIM TE, LEE JM, KIM IK, NAMKOONG SE. AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Lab Invest* 2000; **80**: 587–594.
- [22] KOLI K, KESKI-OJA J. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ* 2000; **11**: 221–229.
- [23] KOROHOODA W, MADEJA Z. Contact of sarcoma cells with aligned fibroblasts accelerated their displacement: computer-assisted analysis of tumour cell locomotion in co-culture. *Biochem Cell Biol* 1997; **75**: 263–276.
- [24] LEIGHTON J. A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells *in vitro*. *J Nat Cancer Inst* 1951; **12**: 545–562.
- [25] LEIGHTON J, TCHAO R. The propagation of cancer, a process of tissue remodeling. Studies in histophysiologic gradient culture. *Cancer Met Rev* 1984; **3**: 81–97.
- [26] LEWALLE JM, BAJOU K, DESREUX J, MAREEL M., DEJANA E, NOEL A, FOIDART JM. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction *in vitro*. *Exp Cell Res* 1997; **237**: 347–356.
- [27] MACDONALD IC, SCHMIDT EE, MORRIS VL, CHAMBERS AF, GROOM AC. Intravital videomicroscopy of the chorioallantoic microcirculation: A model system for studying metastasis. *Microvasc Res* 1992; **44**: 185–199.
- [28] MACDONALD IC, SCHMIDT EE, MORRIS VL, GROOM AC, CHAMBERS AF. *In vivo* videomicroscopy of experimental hematogenous metastasis: cancer cell arrest, extravasation, and migration. [w] Soll DR, Wessels D [red.] Motion analysis of living cells. New York: Wiley-Liss 1998: 263–287.
- [29] MADEJA Z. Ilościowe metody analizy obrazu w genetyce molekularnej. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 87–100.

- [30] MADEJA Z, KOROHODA W. Niektóre zastosowania komputerowych metod analizy obrazu (cytometrii obrazowej) w biologii komórki. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 457–476.
- [31] MAREEL MM, VAN ROY FM, BRACKE ME. How and when do tumor cells metastasize. *Crit Rev Oncol* 1993; **4**: 559–594.
- [32] MAREEL MM, VAN ROY FM, MESSIAEN LM, BOGHAERT ER, BRUYNEEL EA. Qualitative and quantitative analysis of tumour invasion *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Sci Suppl* 1987; **8**: 141–163.
- [33] NIGGEMANN B, MAASER K, LU H, KROCZEK R, ZÄNKER KS, FRIEDL P. Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in three-dimensional collagen lattice. *Cancer Lett* 1997; **118**: 173–180.
- [34] O-CHAROENRAT P, RHYS-EVANS P, MODJTAHEDI H, COURT W, BOX G, ECCLES S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and *in vitro* invasion. *Int J Cancer* 2000; **86**: 307–317.
- [35] OHNISHI T, MATSUMURA H, IZUMOTO S, HIRAGA S, HAYAKAWA T. A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res* 1998; **58**: 2935–2940.
- [36] PAGET S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; **1**: 571–573.
- [37] RUSCIANOD, LORENZONI P., BURGER MM. Murine models of liver metastasis. *Invasion Metastasis* 1995; **14**: 349–361.
- [38] SCHERBARTH S, ORR FW. Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: Effects of interleukin-1 on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest. *Cancer Res* 1997; **57**: 4105–4110.
- [39] VERMEULEN SJ, BRUYNEEL EA, BRACKE ME, DE BRUYNE GK, VENNEKENS KM, VLEMINCKX KL, BREX GJ, VAN ROY FM, MAREEL MM. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of α -catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 4722–4728.
- [40] VERSCHUEREN H, DE BAETSELIER P., DE BRAEKELEER J, DEWIT J, AKTORIES K, JUST I. ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. *EJCB* 1997; **73**: 182–187.
- [41] VERSCHUEREN H, DEWIT J, DE BRAEKELEER J, SCHIRRMACHER V, DE BAETSELIER P. Motility and invasive potency of murine T-lymphoma cells: Effect of microtubule inhibitors. *Cell Biol Int* 1994; **18**: 11–19.
- [42] WEISS L, HARLOS JP, ELKIN G, BIXLER B. Mechanisms for the biomechanical destruction of L1210 leukemia cells: A rate regulator for metastasis. *Cell Biophys* 1990; **16**: 149–159.
- [43] WEISS L, ORR FW, HONN KV. Interaction between cancer cells and microvasculature: a rate-regulator for metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1989; **7**: 127–167.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. A. Mickiewicza 3,
e-mail: Zibi@mol.uj.edu.pl